

氏名	たなべ 田邊	かおり 香
学位の種類	博士（農学）	
学位記番号	甲第334号	
学位授与年月日	平成16年 3月12日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Analysis of the novel function of the Sla1 protein in meiosis of fission yeast (分裂酵母の減数分裂における Sla1 タンパク質の新機能の解析)	
学位論文審査委員	(主査) 川向 誠 (副査) 田中克典 加藤昭夫 山野好章 松田英幸	

学位論文の内容の要旨

減数分裂は酵母からヒトにいたるほぼ全ての真核生物で見られる生命現象である。しかしながらその制御機構については未だ不明な点が多く、体細胞分裂の制御機構の理解に比べ著しく遅れている。分裂酵母は扱いの簡便さと減数分裂過程の同調系が確立されているという利点を持ち、減数分裂過程を含む分子機構を解析する上で良いモデルとなりうる。分裂酵母は栄養源が枯渇すると異なる細胞同士で接合し、DNA 合成と二回の減数分裂を経て厳しい条件下でも生育が可能な胞子を形成するが、この胞子が高等真核生物の配偶子に相当する。

分裂酵母の減数分裂過程を制御する因子として癌原遺伝子ホモログである *ras1* があるが、この *ras1* を破壊した分裂酵母は胞子形成不能になる。この表現型を抑圧するような因子は減数分裂・胞子形成過程に関与するものであると考えられ、これまでにそのような因子の取得、解析が行われてきた。

Chapter IIにおいて著者は分裂酵母のヒト La 蛋白質のホモログである Sla1 蛋白質が、C 末端領域を欠損した時に haploid meiosis（半数体減数分裂）と呼ばれる異常な胞子形成を誘導することを述べた。haploid meiosis とは分裂酵母の減数分裂の正の制御因子 Mei2 の恒常的活性化型変異体を発現した場合や、Mei2 をリン酸化して不活性化する減数分裂の負の制御因子 Pat1 を不活性化した時に見られる特徴的な表現型であり、最終的に形成された胞子は完全な染色体を含まないために殆どが死に至る。

La 蛋白質は、ヒトの自己免疫疾患全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の血清中に多量に含まれる自己抗原として同定された。La 蛋白質ファミリーは N 末端領域に非常に保存性の高い La モチーフ (RRM1)、中央領域には RRM2、配列上の保存性は低い塩基性アミノ酸に富む C 末端領域から構成されている。La 蛋白質ファミリーは RRM1 を介して tRNA 前駆体に結合し、プロセッシング過程を保護することが知られているが、その他の生理的機能については未知なる部分が多い。

C 末端領域欠損型 Sla1 (以下 Sla1ΔC) は *ras1* 欠損の胞子形成不能を抑圧する因子として取得された。その後 Sla1ΔC が *ras1* 欠損株以外の胞子形成不能株も抑圧出来ること、さらに片方の接合型細胞しか

存在しないため栄養源枯渇条件でも接合・孢子形成するはずのないヘテロ一倍体野生型株(*h* W.T.)においてさえ haploid meiosis と呼ばれる異常な孢子形成を誘導することが分かったが、全長の *sla1* (以下 Sla1FL) にはその効果は全く見られず、単独破壊株においても孢子形成に関して顕著な表現型は見られなかった。つまり、haploid meiosis 誘導は Sla1 が C 末端領域を欠損した時のみに特異的に現れる効果であることが分かった。

Sla1ΔC は La motif, RRM2 の二つの領域から構成されているが、孢子形成誘導効果には La motif は全く必要ではなく RRM2 さえあれば十分であった。さらに、RRM が RNA を認識するのに必要な RNP 領域を両方ディレーションした変異体でも孢子形成誘導能を有していたことから、haploid meiosis 誘導能に必要とされる領域は RRM2 領域に含まれているものの、RNA 結合能は必要ではないことが分かった。

単独破壊株が顕著な表現型を示さないという観察から、Sla1 は特別な条件下で活性化されて減数分裂誘導に関与するのではないかと考えられた。そこで、減数分裂細胞周期での Sla1p の挙動を調べたところ、窒素源枯渇後の減数分裂前 DNA 合成期から第一減数分裂期にかけて Sla1p の顕著な減少が見られた。さらに、Sla1p が減少する時期においても *sla1*mRNA 量の変動は認められなかったことから、この減少は翻訳後修飾に依存している事が分かった。加えて、Sla1p が減少している時期には切断産物と思われる複数のバンドも検出された。

Sla1ΔC は *mei2*破壊株や *mei2*の転写因子をコードする *ste11*の破壊株では haploid meiosis 誘導効果を示さなかった事から、Mei2 の上流で機能することが示された。*pat1^{ts}* 変異株は 32.5°C 以上で完全に Pat1 が不活性化されるため haploid meiosis が強制的に誘導されて生育不能となり、30°C において中間的な生育状態を示すが、*sla1*破壊は *pat1^{ts}* 変異株の *ts* 性を緩やかに抑圧した。このことは Sla1 と Pat1 の下流の経路に何らかの関わりがあることを示した。Sla1p が減少、切断産物が出現する時期が減数分裂移行の鍵となる因子 Mei2 の活性化時期と一致するという事実もこの知見を支持するものである。

Chapter IIIにおいて著者は Sla1ΔC による haploid meiosis 誘導が、Pat1-Mei2 経路を活性化して起こることを示した。Sla1ΔC を発現した時 *mei2*mRNA と Mei2p の量が共に増量していた。これは Mei2 の転写因子であり、Pat1 によって負に制御される Ste11 が脱抑制された結果であると考えられる。また、Mei2p の増量は mRNA の増量のみならず、蛋白質安定性の昂進にも依存していた。Mei2p の安定性は Pat1 によるリン酸化状態に強く依存することから、Sla1ΔC 共発現によって Mei2 が脱リン酸化状態にあると考えられた。また、Ste11 の局在も Sla1ΔC 共発現によって強制的に核に移動した。これは Pat1 を不活性化した時の Ste11 の挙動と同様である。また、Yeast two hybrid 法を用いて Pat1 と Sla1 の相互作用を調べたところ、Sla1FL は Pat1 と全く結合しないが、Sla1ΔC は Pat1 と非常に強く結合することが分かった。以上の結果より、Sla1ΔC が Pat1 を不活性化した結果 haploid meiosis が誘導されると推論した。

これらの結果にはこれまで考えられてきた La タンパク質の機能に新たな別の機能があるということを示したもので、減数分裂における新たな制御機構の一端を明らかにするとともに自己免疫疾患の抗原タンパク質 La の新機能を示唆したものである。

論文審査の結果の要旨

分裂酵母の減数分裂過程を制御する因子として癌原遺伝子ホモログである *ras1* があるが、この

ras1を破壊した分裂酵母は孢子形成不能になる。この表現型を抑圧するような因子は減数分裂・孢子形成過程に関与するものであると考えられ、これまでにそのような因子の取得、解析が行われてきた。

本論文ではまず分裂酵母のヒトLa蛋白質のホモログであるSla1蛋白質が、C末端領域を欠損した時にhaploid meiosis (半数体減数分裂) と呼ばれる異常な孢子形成を誘導することを述べている。haploid meiosisとは分裂酵母の減数分裂の正の制御因子Mei2の恒常的活性化型変異体を発現した場合や、Mei2をリン酸化して不活性化する減数分裂の負の制御因子Pat1を不活性化した時に見られる特徴的な表現型であり、最終的に形成された孢子は完全な染色体を含まないために殆どが死に至る。

La蛋白質は、ヒトの自己免疫疾患全身性エリテマトーデス(SLE)患者の血清中に多量に含まれる自己抗原として同定された。La蛋白質ファミリーはN末端領域に非常に保存性の高いLaモチーフ(RRM1)、中央領域にはRRM2、配列上の保存性は低いが塩基性アミノ酸に富むC末端領域から構成されている。La蛋白質ファミリーはRRM1を介してtRNA前駆体に結合し、プロセシング過程を保護することが知られているが、その他の生理的機能については未知なる部分が多い。

本論文では一連の研究により以下の結果を得ている。

1. C末端領域欠損型Sla1 (Sla1 Δ C) はras1欠損の孢子形成不能を抑圧する因子として取得した。
2. Sla1 Δ Cがras1欠損株以外の孢子形成不能株も抑圧し、ヘテロー倍体野生型株においてさえhaploid meiosisと呼ばれる異常な孢子形成を誘導した。
3. 全長のsla1 (Sla1FL) にはその効果は全く見られず、単独破壊株においても孢子形成に関して顕著な表現型は見られなかった。
4. 孢子形成誘導効果にはSla1 Δ CのLa motifは全く必要ではなくRRM2さえあれば十分であった。
5. haploid meiosis誘導能に必要なとされる領域はRRM2領域に含まれているものの、RNA結合能は必要ではなかった。
6. 窒素源枯渇後の減数分裂前DNA合成期から第一減数分裂期にSla1蛋白質の顕著な減少が見られた
7. Sla1蛋白質が減少する時期においてもsla1mRNA量の変動は認められなかった。
8. Sla1蛋白質が減少している時期には切断産物と思われる複数のバンドが検出された。
9. Sla1 Δ Cはmei2破壊株やmei2の転写因子をコードするstel1の破壊株ではhaploid meiosis誘導効果を示さなかった。
10. sla1破壊はpat1ts変異株のts性を緩やかに抑圧した。
11. Sla1 Δ Cを発現した時mei2mRNAとMei2pの量が共に増量していた。
12. Mei2pの増量はmRNAの増量のみならず、蛋白質安定性の昂進にも依存していた。
13. Ste11の局在もSla1 Δ C共発現によって強制的に核に移動した。
14. Yeast two hybrid法において、Sla1FLはPat1と全く結合しないが、Sla1 Δ CはPat1と非常に強く結合した。

以上の結果より、Sla1 Δ Cが減数分裂の中心的なキナーゼであるPat1を不活性化した結果haploid meiosisが誘導されると推論している。

これらの結果はこれまで考えられてきたLa蛋白質類の機能に新たな機能があるということを示したもので、減数分裂における新たな制御機構の一端を明らかにするとともに自己免疫疾患の抗原蛋白質Laの新機能を示唆したものである。これまで考えられていたRNA結合蛋白質としてのLaの機能以外に減数分裂に関する機能を見いだしたもので、極めて新規性の高い発見であると言える。

これらの発見は、自己免疫疾患とLa機能以外との関連性を考える上で1つの重要な可能性を提供するもので、やがて多方面の研究者から注目されていくであろうと考えられる。

従って、本研究は学位論文として高い独創性と十分な価値のあるものであると判定する。